

ORSAY

Série A

N° d'Ordre :

889

Sujet de la Thèse

EFFETS PRIMAIRES, SECONDAIRES ET A DISTANCE DES RAYONS X
SUR LA CULTURE HISTIOTYPIQUE DE LA MOELLE, EPINIERE LOMBO-
SACREE DE L'EMBRYON DE POULET DE 7 JOURS.

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles
enregistrée au C.N.R.S. sous le Numéro AO 6655.

DENEFLE Jean - Pierre

Soutenue le 12 Janvier 1972 au Centre d'Orsay de l'Université
Paris-Sud (XI) devant le Jury :

MM. LENDER	:	Président
BEAUMONT	:	Rapporteur
COUTEAUX	:	Examineurs
FAVARD	:	

There is in the

... of the ...
... of the ...
... of the ...

... of the ...

... of the ...
... of the ...

... of the ...

... of the ...
... of the ...

... of the ...
... of the ...
... of the ...
... of the ...



Digitized by the Internet Archive
in 2026

LA RADIOSENSIBILITÉ (*) EN CULTURE *IN VITRO* DES NEUROBLASTES ET NEUROCYTES CHEZ DES VERTÉBRÉS HOMÉOTHERMES

PAR J. P. DENÈFLE (1)

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	202
LA CROISSANCE ET LA DÉGÉNÉRESCENCE EN CULTURE <i>IN VITRO</i> DES NEUROBLASTES ET DES NEUROCYTES DE VERTÉBRÉS HOMÉOTHERMES	203
A. — Croissance témoin : différenciation, régénération et croissance nerveuse <i>in vitro</i>	203
B. — Dégénérescence spontanée	204
LÉSIONS PRIMAIRES DES NEUROBLASTES ET DES NEUROCYTES IRRADIÉS PAR LES RAYONS X ET CULTIVÉS <i>IN VITRO</i>	205
A. — Lésions obtenues en culture de moelle épinière et de ganglions rachidiens irradiés après excision	205
B. — Lésions obtenues après irradiation totale d'une culture nerveuse lancée.	207
1° Cultures organotypiques	208
2° Cultures histiotypiques.	209
LÉSIONS SECONDAIRES DES NEURITES DE GANGLIONS ET DE TISSUS NERVEUX D'EMBRYONS D'HOMÉOTHERMES IRRADIÉS <i>IN TOTO</i>	212
A. — Expériences de GOLDRING.	212
B. — Observations personnelles	215
C. — Conclusions	216
LÉSIONS A DISTANCE DES NEURITES SAINS OBTENUES EN CULTURE APRÈS MISE EN JEU D'ACTIONS EXERCÉES <i>IN OVO</i> ET <i>IN VITRO</i> PAR UN TISSU IRRADIÉ	216
A. — Dépôts et greffes sur la membrane chorio-allantoïdienne.	218
1° Effets des culots de broyats entiers d'embryons de poulet irradiés sur un embryon sain.	218
2° Effets de greffons nerveux irradiés sur la culture de la moelle du receveur.	219
3° Conclusions.	219
B. — Lésions provoquées <i>in vitro</i> par juxtaposition et conditionnement de tissus nerveux sains et irradiés.	220
1° Interactions de 2 tissus homologues.	220
2° Interactions de 2 tissus hétérologues.	221
3° Conclusions.	221

(*) Cette mise au point est extraite d'une thèse (Orsay, 12 janvier 1972), enregistrée aux Archives originales du C. N. R. S. sous le n° A. O. 6655.

(1) Laboratoire de Biologie-Vertébrés, Université Paris-Sud, 91-Orsay.

CONCLUSION : MÉCANISMES PROPOSÉS POUR L'INTERPRÉTATION DES LÉSIONS NERVEUSES, PRIMAIRES, SECONDAIRES ET A DISTANCE.	225
A. — Mécanismes proposés dans la littérature	225
1 ^o Actions primaires	225
2 ^o Actions secondaires.	226
3 ^o Actions à distance.	227
B. — Mécanismes possibles proposés par nos conclusions.	227
1 ^o Actions primaires	227
2 ^o Actions secondaires.	228
3 ^o Actions à distance.	228
BIBLIOGRAPHIE	230

INTRODUCTION

Des mises au point précédentes (MAY et GUIMARD, 1964; MAY et COURTEY, 1966) ont précisé que la croissance des cellules nerveuses embryonnaires était contrôlée par des facteurs chimiques et mécaniques. Il restait à étudier les actions exercées sur les neuroblastes par des facteurs physiques tels que les radiations ionisantes. Les nombreuses interprétations de leurs modes d'action ont fait intervenir une terminologie variée dont les définitions ont souvent des acceptions très différentes. Aussi fixerons-nous les critères des trois types d'actions primaires, secondaires et à distance, dues aux rayons ionisants, tels qu'on peut les préciser d'après la littérature.

Les *actions primaires* sont celles qui sont provoquées par l'irradiation d'un tissu isolé de son organisme d'origine. Les effets provoqués s'opposent à ceux qui résultent d'*actions secondaires* provenant cette fois de l'irradiation totale d'un organisme entier. Celles-ci sont les effets exercés sur un tissu donné par d'autres tissus irradiés en même temps que lui dans le même organisme. Enfin, nous conviendrons d'appeler *actions à distance* celles dont les effets de tissus ou de broyats de tissus d'un organisme irradié s'expriment sur un deuxième organisme sain cible (greffe, dépôt, injection, parabiose, etc.).

Ce sont les effets perceptibles en culture *in vitro* de ces trois types d'actions que nous suivrons tout particulièrement au niveau des neuroblastes et des neurocytes ganglionnaires et médullaires de l'embryon de poulet, sans négliger pour autant les résultats obtenus *in situ* sur d'autres espèces.

Nous essayerons de répondre aux questions suivantes :

1^o Existe-t-il des radiolésions primaires du système nerveux embryonnaire ? Sont-elles le résultat d'une action spécifique des rayons X sur le névraxe seul ou bien la sommation d'effets primaires et d'effets secondaires prenant naissance dans les tissus voisins ?

2° Ces effets secondaires ont-ils une origine vasculaire ou histolytique ?

3° Enfin, y a-t-il libération de produits diffusibles par les tissus irradiés et peuvent-ils agir sur d'autres tissus sains qui les éprouvent. Les effets à distance obtenus *in ovo* sont-ils semblables à ceux provoqués *in vitro* ?

Avant d'aborder l'étude de ces effets et des questions qu'ils soulèvent, nous rappellerons les principaux travaux effectués sur la croissance et la dégénérescence témoins des neuroblastes et des neurocytes cultivés *in vitro*.

LA CROISSANCE ET LA DÉGÉNÉRESCENCE EN CULTURE *IN VITRO* DES NEUROBLASTES ET DES NEUROCYTES DE VERTÉBRÉS HOMÉOTHERMES

A. — CROISSANCE TÉMOIN : DIFFÉRENCIATION, RÉGÉNÉRATION ET CROISSANCE NERVEUSE *in vitro*

Dès 1907, HARRISON a cultivé le premier des petits morceaux du tube neural de bourgeon caudal de Grenouille en présence de lymphe coagulée. Il a vu la transformation de certaines cellules cultivées en neurocytes par acquisition d'expansions typiques. Ces dernières se ramifient et leurs apex ressemblent à ceux décrits *in situ* par RAMON Y CAJAL (1890), chez l'embryon de poulet. Ces expansions, axones et apex, sont seules visibles en culture, car leurs péricaryons peu mobiles restent associés au sein de l'explant. Ces fibres nerveuses ont été étudiées tout particulièrement par une série de chercheurs parmi lesquels on peut citer avec MAY et GUIMARD (1964) : BURROWS (1911), SHOREY (1911); LEWIS et LEWIS (1912); MATSUMOTO (1920); LEVI (1917, 1934, 1941); LEVI et MEYER (1933, 1937, 1941); LEVI-MONTALCINI et LEVI (1943); MEYER (1938); OLIVO (1927); HUZELLA (1938); ESAKI (1929); GRIGORIEFF (1931); MARTINOVIC (1931) et IGNATIEVA (1938).

Ils ont tous cultivé en goutte pendant des fragments de tissus névrauxiques : cerveau, moelle, ganglions d'embryons d'Oiseaux et de Mammifères en présence de plasma et d'extraits embryonnaires. C'est à eux que l'on doit la démonstration de la croissance radiaire des fibres en culture primaire sans lavage ni repiquage, la présence de neurofibrilles, de la membrane ondulante de certains apex, des corps de Nissl et, enfin, la polarité du neuroblaste.

Plus tard, le microscope à contraste de phase a permis l'étude sur le vivant de ces fibres nerveuses : LEWIS (1950); POMERAT et COSTERO (1951) et HUGHES (1953). Grâce à cette méthode, ils ont pu ainsi préciser :

— la vitesse de croissance d'une fibre de myélocéphale d'embryon de poulet; — les phénomènes de pinocytose apicale (LEWIS, 1931) déjà aperçus par MATSUMOTO (1920); — les anastomoses plus ou moins

transitoires des fibres (GODINA); — les deux types fondamentaux d'apex (GODINA) : apex à panache de filopodes radiaires et apex à expansion formée d'une fine couche d'axoplasme.

Nous-même, avec MAY et COURTEY (1960), grâce à la méthode de culture en chambre à huile de DE FONBRUNE, avons pu préciser les faits suivants dans une culture histiotypique de moelle épinière lombo-sacrée de poulet de sept jours :

— l'existence de deux types de fibres nerveuses : l'un qui correspond à la différenciation *in vitro* des neuroblastes en neurocytes et l'autre qui est le résultat de la régénération des axones des jeunes neurocytes coupés lors de l'explantation; — la pulsation de la surface de l'explant due à des mouvements cellulaires individuels après 1 heure de culture; — la rotation lente et pendulaire des noyaux des médulloblastes déjà perçus par POMERAT; — l'apparition de petits cônes d'émergence avec arrêt des pulsations cellulaires; — l'aspect piriforme des neuroblastes avec intégration dans l'expansion principale d'une partie de sa masse par poussées successives; — une activité membranaire intense de l'expansion avec légères excroissances latérales très mouvantes qui précèdent la différenciation apicale du jeune axone; — la forte courbure des jeunes filopodes sur la surface de l'explant; — le neurocladisme flagrant des fibres néoformées; — la croissance radiaire à l'explant et cellulifuge.

Nous avons retrouvé les deux types fondamentaux d'apex distingués par GODINA en 1955.

Enfin, cette méthode a permis de voir des mouvements de va-et-vient apex-centre trophique concrétisés par des granules foncés se déplaçant sur des fibrilles orientées et constituant une véritable *bipolarité axoplasmique des fibres néoformées*.

B. — DÉGÉNÉRESCENCE SPONTANÉE

Nous rappellerons les principales phases d'involution cytologique suivies par microcinématographie image par image en contraste de phase dans une culture primaire de moelle épinière de poulet de sept jours :

1. Mouvements et relations précoces accélérés entre neurites voisins.
2. Granulisation et vésiculisation des neurites.
3. Altération des réseaux nerveux et leur résolution en de nombreuses gouttelettes axoplasmiques dispersées dans tout le milieu de culture lui-même altéré par les éléments cataboliques.
4. Les dégénérescences procèdent par étapes successives brusques et ne frappent pas toutes les fibres d'une même culture au même moment.
5. L'aspect moniliforme est réversible : au-delà, la dégénérescence est inéluctable.

Ce sont ces critères cytologiques témoins qui nous serviront de références dans l'étude des lésions primaires des neuroblastes embryonnaires manifestées *in vitro*.



LÉSIONS PRIMAIRES DES NEUROBLASTES ET DES NEUROCYTES IRRADIÉS PAR LES RAYONS X ET CULTIVÉS IN VITRO

A. — LÉSIONS OBTENUES EN CULTURE DE MOELLE ÉPINIÈRE ET DE GANGLIONS RACHIDIENS IRRADIÉS APRÈS EXCISION

Ce mode d'intervention s'intègre bien parmi les méthodes directes de l'embryologie expérimentale puisque l'irradiation est localisée à un territoire précis de l'embryon. Cette méthode consiste à considérer les actions des rayons X sur le tissu nerveux isolé (actions primaires). Elle permet d'éliminer l'influence de l'organisme et d'appliquer des doses que l'embryon ne pourrait supporter (tableau I)

TABLEAU I
*Effets primaires des rayons X
sur la culture de neuroblastes et neurocytes
de moelles épinières irradiées excisées.*

	Doses appliquées	Modalités et durée de l'irradiation	Durée de la remise à 38° après irradiation	Test = culture en milieu standard sain de la moelle irradiée	Effets primaires observés après culture
<i>In vitro</i>	3.400 à 4.500	Moelle irradiée après son excision		Culture histiotypique en chambre à huile de FONBRUNE	États cytologiques et taux de croissance des fibres néoformées
	par doses cumulatives (3 irradiations)	48 à 60 minutes à 70 kV et 3 mA	0 h.	Moelle irradiée prélevée 24 h.	

En 1956, I. P. GOLDRING a eu recours à cette méthode. Des ganglions lombo-sacrés d'embryons de poulet de 6 à 12 jours sont irradiés avec des doses variées : 500, 2.000, 5.000, 32.000, 64.000 et 128.000 r. Elle a obtenu les résultats suivants :

Après 128.000 r : disparition du tissu conjonctif de la capsule du

ganglion. Désagrégation de l'ensemble de la culture. Vacuolisation nucléaire et cytoplasmique, cytolyse généralisée.

Après 64.000 r : absence de croissance et de migration cellulaire.

Après 32.000 r : croissance des neurites non affectée de façon statistiquement significative 48 heures après l'irradiation. Au-delà, croissance inférieure à celle des neurites témoins.

Elle conclut enfin que la dose létale (D. L.) est comprise entre 32.000 et 64.000 r et que les ganglions de six jours sont plus sensibles que ceux de 12 jours.

En 1960, avec MAY, nous avons montré que l'irradiation *in vitro* de moelles épinières lombo-sacrées de poulet de sept jours nécessite de fortes doses pour provoquer des lésions de fibres en culture. Nous avons ainsi montré que :

1. Les effets primaires des rayons X (3.400, 3.800 et 4.500 r) n'inhibent pas totalement la différenciation des neuroblastes en neurocytes ni la croissance en longueur de leurs fibres en culture histiotypique. En culture témoin, les explants nerveux ont une durée de vie de l'ordre de 48 heures, après quoi ils dégèrent spontanément. Les rayons X réduisent cette survie de moitié et la radiodégénérescence apparaît dès 24 heures *in vitro*.

2. Cette dégénérescence se manifeste d'autant plus rapidement que la dose est plus grande (4.500 r).

3. La dose de 3.800 r correspond à la dose létale 50 pour 100 24 heures des fibres cultivées : elle provoque l'inhibition de la croissance dans la moitié des cultures observées 24 heures après l'irradiation.

4. Les doses de 3.400 et 3.800 r provoquent après une période de croissance moyenne stimulée une dégénérescence précoce des fibres par vésiculation et granulisation. Ces lésions sont semblables à celles d'une culture témoin vieillie et ne sont donc pas spécifiques.

5. Ces effets primaires ne se font sentir *in vitro* qu'après une latence de 24 heures.

6. Les neurocytes néoformés traduisent une certaine radiorésistance de la moelle cultivée après son irradiation une fois excisée. Le milieu de culture sain permet à la moelle une survie qu'elle n'aurait pas eue dans l'embryon irradié *in toto* avec les mêmes doses (fig. 1).

— En conclusion, nos résultats montrent que la moelle épinière, comme les ganglions rachidiens, manifeste une certaine radiorésistance, car les mêmes doses appliquées à l'embryon lui sont à tout coup fatales. On peut constater une plus grande sensibilité de la moelle par rapport aux ganglions. Cette différence de sensibilité peut s'expliquer en dehors des différences cellulaires évidentes par le fait qu'à 7 jours, les neuroblastes médullaires sont en pleine différenciation donc sont plus sensibles que les cellules ganglionnaires. D'autre part, ce sont des fragments de moelle débarrassée de ses méninges qui sont irradiés, et cette mise à nu paraît favoriser l'action primaire des rayons X. Dans les deux cas, ganglions

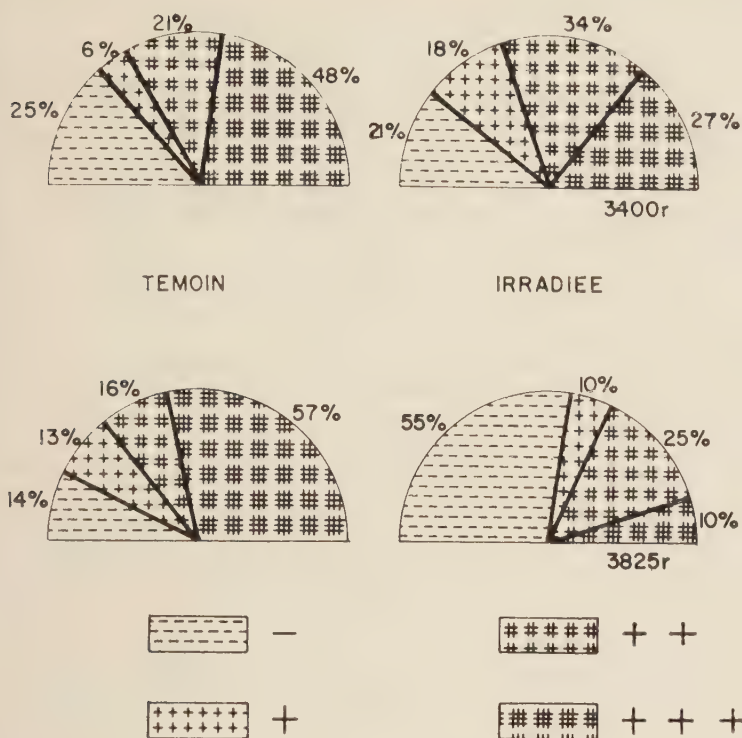


Fig. 1. — Diagrammes de croissance nerveuse de cultures témoin et irradiée.

et moelle, tous deux coupés de toute influence de leur organisme d'origine, subissent en majorité des lésions primaires, directes et indirectes, perceptibles en culture au niveau des neurites néoformés.

Cette méthode d'irradiation de tissu nerveux excisé n'a été que fort peu utilisée; en revanche, celle qui consiste à irradier une culture totale a fait l'objet de nombreuses recherches.

B. — LÉSIONS OBTENUES APRÈS IRRADIATION TOTALE D'UNE CULTURE NERVEUSE LANCÉE

Dans ce cas, l'explant est irradié en même temps que son milieu de culture. Ce dernier peut réagir sur l'explant, mais les doses nécessaires à cette réaction sont supérieures en général à 5.000 r (TROWELL, 1965).

Parmi les principaux travaux concernant l'irradiation du milieu de culture ou de l'un de ses constituants, nous rappellerons ceux de GOLD-FEDER (1940); PETERS (1959); KUYERS et SMETS (1962). Comme ce sont les actions globales des rayons X sur une culture entière que nous avons

surtout étudiées, nous préciserons dans cette mise au point les principaux résultats obtenus avec ce mode d'intervention.

Ce sont surtout les ganglions rachidiens du Rat et du poulet qui ont été irradiés au début ou au cours de leurs cultures histiotypiques : AMATO (1920); BUCCIANTE et FOA (1933); LEVI et MEYER (1941); GOLDRING (1956); CARLESi et OLIVO (1969), et surtout organotypiques : QUASTEL et POMERAT (1963); MASUROVSKY, BUNGE et BUNGE (1967).

Les principales conclusions sont les suivantes :

1° Cultures organotypiques.

a) *Lésions des centres trophiques.* — POMERAT et QUASTEL ont cultivé en chambre de Rose sur film de collagène des ganglions de rats nouveau-nés. Les cultures faites sont exposées au Cobalt 60 et reçoivent 2.000 r/minute pendant 2 à 3 minutes à 32-37° C. Les doses varient de 5.000 à 100.000 r. Ce sont seuls les péricaryons qui ont été étudiés : les principales altérations observées portent sur :

— une réduction du volume cellulaire; — un noyau excentré; — des vacuolisations et des altérations de l'organisation cytoplasmique (zone sphérique pâle, fibreuse et lamellaire). Après 7.200 r, les neurones ne manifestent ces altérations qu'après une semaine de latence; après 20.500 r, 4 jours suffisent pour la perception de ces mêmes effets. Après 100.000 r enfin, la destruction des neurones est totale au bout de 3 à 4 jours. Tous les neurones, conclut POMERAT, n'ont pas le même degré de sensibilité aux rayons X et certains, 42 jours après leur irradiation à 41.000 r, manifestent encore une rotation nucléaire.

En 1967, MASUROVSKY et ses collaborateurs ont étudié aussi les modifications des cellules ganglionnaires de fœtus de Rat de 18 à 20 jours. Les cultures organotypiques sont irradiées après 8 ou 12 semaines *in vitro*. Ils ont noté, au microscope électronique, les effets suivants :

— la chromatolyse et l'altération des nucléoprotéines; — une vacuolisation cytoplasmique avec formation de vacuoles autolytiques et de cytolysosomes avec présence dans leur voisinage de structures lamellaires et de figures myéliniques; — la présence de zones « toxiques » dans le cytoplasme stimulant l'activité autolytique et la réutilisation par la cellule de produits de dégradation; — l'intervention des hydrolases acides libérées après altération de la perméabilité des membranes des lysosomes; — l'altération de mitochondries (réduction et modification des membranes internes des crêtes) et, enfin, dépôts de granules glyco-géniques près des mitochondries altérées.

Leurs conclusions concordent et mettent en valeur la vacuolisation générale des péricaryons après irradiation.

b) *Lésions des axones proprement dits.* — MASUROVSKY et ses collaborateurs les ont aussi étudiées sur le même matériel que précédemment.

Pour eux, la séquence des altérations cytologiques qu'ils précisent est indépendante des effets secondaires attribuables à des lésions inflammatoires ou vasculaires. Les résultats constatés sont les suivants :

— la relative résistance de l'axone à l'irradiation déjà précisée par ANDRES; et, — la forte sensibilité des cellules de soutien (GOLDRING) et des cellules de Schwann. Celles d'entre elles qui sont associées aux fibres myéliniques sont plus radiorésistantes que les autres; ces dernières ayant une activité métabolique intense semblent plus radiosensibles; — l'apparition de dépôts glycogéniques dans les axones; — l'altération des couches de myéline.

En bref, l'irradiation des cultures organotypiques des ganglions rachidiens du Rat ou de poulet a permis la mise en évidence de :

— la sensibilité différentielle aux rayons X à l'intérieur d'un même neurone : le centre trophique étant plus sensible que l'axone, et de, — la forte radiosensibilité des cellules névrogliques embryonnaires.

Ces conclusions sont, pour ces auteurs, la conséquence d'actions primaires « directes » des rayons X.

2° Cultures histiotypiques.

a) *Lésions axonales.* — Parmi les principaux travaux, rappelons ceux de G. LEVI et de H. MEYER (1941), celui de I. P. GOLDRING (1956) et, enfin, de CARLESI et OLIVO (1969).

LEVI et MEYER ont irradié des cultures histiotypiques de ganglions rachidiens lombaires d'embryons de poulet aux 7^e et 14^e jours d'incubation. Les cultures sont exposées à l'émanation C du radium placé dans un petit tube de verre superposé à la lamelle immédiatement après la mise en culture ou quelques heures après. La période d'irradiation varie de 2 à 15 heures à 37° C. Leurs résultats sont les suivants :

— La dissociation entre migration des fibrocytes et régénération des fibres a été obtenue par des faibles doses, les doses les plus fortes endommageant les neurones. La régénération des neurites est limitée et ceux qui se développent sont gravement lésés. Il semble que les fibrocytes soient plus radiosensibles que les neurones. Enfin, les neurites néoformés ont tendance à se grouper en cordons et en faisceaux anastomosés.

GOLDRING confirme ces résultats en 1956 et précise que la radiosensibilité des cellules ganglionnaires est plus grande lorsqu'elles sont irradiées *in ovo* et non plus *in vitro*. Elle classe les trois catégories cellulaires étudiées : macrophages, fibroblastes et neuroblastes par ordre de sensibilité décroissante aux rayons X, les neuroblastes étant les plus résistants aussi bien irradiés *in vitro* qu'*in ovo*.

Plus récemment, CARLESI et OLIVO (1969) ont irradié non plus des ganglions, mais les lobes optiques du poulet de 5 à 13 jours au moment même ou bien 24 heures après l'explantation. Leurs conclu-

sions confirment et complètent les précédentes ; ils ont montré que :

1. La radiosensibilité des fibres des ganglions est inférieure à celle des fibres des lobes optiques.

2. La dégénérescence des neurites de ces lobes n'est pas spécifique et consiste en un arrêt de l'amiboïsme apical suivi d'une désagrégation des axones présentant de nombreuses verrucosités.

3. La dose qui inhibe la régénération des fibres est comprise entre 2.500 et 5.000 r.

4. Enfin, le centre trophique est plus sensible que les prolongements car, si l'irradiation de l'explant au moment de sa mise en culture inhibe sa croissance, la même dose appliquée 28 ou 30 heures après *in vitro* l'entrave beaucoup moins fortement. Le centre trophique est plus radiosensible que les prolongements et son intégralité est nécessaire pour leur régénération.

Toutes ces conclusions, bien qu'obtenues avec des matériels différents, mettent en relief un fait qui semble général au tissu nerveux d'embryons d'Homéothermes : la sensibilité des péricaryons et la radorésistance relative de leurs expansions.

b) *Lésions apicales*. — Pour compléter l'étude des effets primaires des rayons X sur la croissance *in vitro*, nous nous intéresserons au comportement des apex des fibres irradiées cultivées en plein épanouissement axonal, c'est-à-dire 24 heures après leur explantation. Rappelons que la cinétique apicale a fait l'objet de nombreux travaux.

Dès 1926, MOSSA a étudié les variations de la vitesse des fibres nerveuses en culture en fonction de la température chez l'embryon de poulet. Plus tard, LEVI (1934) a suivi la croissance des expansions par des séries de dessins indiquant les changements subis par l'extrémité d'un neurite toutes les 5 minutes.

En 1950, LEWIS utilise le cinéma image par image et POMERAT, ainsi que COSTERO y adjoignent un an plus tard l'observation sur le vivant au contraste de phase. HUGHES (1953) applique cette même technique à la moelle épinière du poulet. Le milieu de culture en goutte pendant comprend de l'extrait embryonnaire et du plasma de Coq.

PETERSON et MURRAY, en 1955, GODINA la même année, et enfin ROSE (1963) utilisent tous ce même matériel avec la méthode d'observation. Ils ont pu suivre ainsi le dynamisme apical des fibres nerveuses tel que nous l'avons précédemment décrit. Rappelons seulement les trois conclusions suivantes :

- 1^o échange de matériaux entre centre trophique et apex par un double flux axonal (WEISS);
- 2^o échange avec le microenvironnement, activité apicale d'endocytose et de pinocytose (ROSE);
- 3^o détermination des vitesses horaires moyennes : 23,5 μ /heure à 38° pour LEVI, 23 μ /heure à 39° pour MOSSA, et de 26 μ /heure à 38° pour HUGHES.

Nous-même avons confirmé ces conclusions (fig. 2) avant d'étudier

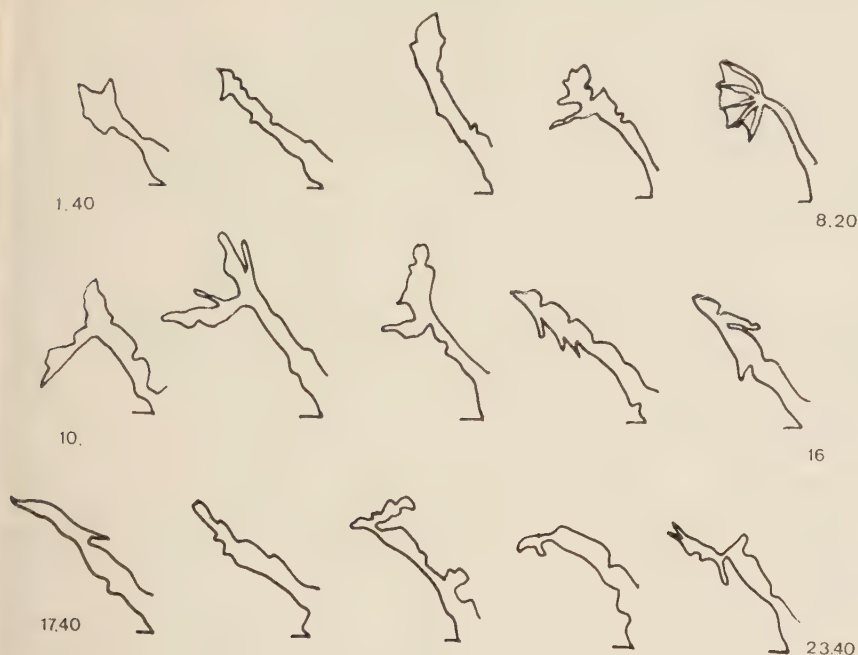


Fig. 2. — Polymorphisme apical d'une culture témoin de 24 heures
(les nombres correspondent aux temps).

les répercussions de l'irradiation d'une culture semblable irradiée en plein essor axoplasmique. La double polarité axoplasmique du neurite rend difficile l'interprétation du mode d'action primaire des rayons X sur la croissance apicale *in vitro*. Ces derniers peuvent : — agir sur le centre trophique du neurocyte dont ils dérèglent la néosynthèse protéique, — altérer le milieu de culture proprement dit; les métabolites modifiés agissent en retour par action indirecte sur l'apex par la voie de l'endocytose, — modifier enfin la perméabilité des membranes et des lysosomes apicaux.

Nos conclusions peuvent être ainsi résumées :

1^o La croissance apicale est stimulée pendant la période qui suit l'irradiation. La vitesse moyenne horaire de $28,4 \mu$ /heure augmente par rapport à la vitesse témoin de 9μ environ. Cette stimulation est semblable à celle constatée dans la culture d'une moelle excisée, puis irradiée avant son explantation.

2^o L'apex irradié traverse une seconde période d'inertie et de dégénérescence concrétisée par : une perte de vitesse de $18,7 \mu$ par rapport à la vitesse stimulée et de 10μ par rapport à la vitesse témoin (tableau II).

3^o La dégénérescence ne se manifeste qu'après 1,40 h de latence *in vitro* après l'irradiation. Elle se traduit par une rétraction et une granulation des filopodes apicaux qui précèdent une forte verrucosité

TABLEAU II

*Vitesses horaires moyennes et croissances des apex
de cultures témoin et irradiée (2.000 r) après 24 heures in vitro.*

A. = Apex	Gains moyens		Pertes moyennes	
	A. témoin	A. irradié	A. témoin	A. irradié
Durées moyennes (minutes).	54	102	—	216
Longueurs moyennes (μ).	12,4	32	—	16,3
Vitesses horaires moyennes (μ /heure).	19,8	28,4	—	9,7
	1 ^{re} période de gain		2 ^e période de perte	

des axones (faciès moniliforme) suivie d'une désagrégation irréversible (fig. 3 *a* et *b*).

— Nos conclusions complètent et corroborent les précédentes et mettent l'accent sur les effets perceptibles sur les apex vivants des actions primaires dues aux rayons X. Pour faire jouer au mieux les effets secondaires des rayons X tels que nous les avons définis, l'irradiation de l'organisme entier avant de cultiver son tissu nerveux semble particulièrement favorable et fera l'objet du chapitre suivant.

LÉSIONS SECONDAIRES DES NEUROBLASTES ET DES NEUROCYTES DE GANGLIONS ET DE TISSUS NERVEUX D'EMBRYONS D'HOMÉOTHERMES IRRADIÉS *IN TOTO*

Ce type d'intervention consiste à soumettre un organisme entier à l'action de l'irradiation et relève des méthodes embryologiques expérimentales dites indirectes. Les effets secondaires de tissus irradiés en même temps que le tissu nerveux agissent alors sur lui.

Parmi les principaux travaux relatifs à cette méthode expérimentale, nous citerons ceux de GOLDRING (1956) avant de donner nos propres conclusions.

A. — EXPÉRIENCES DE GOLDRING

Elle a irradié des œufs de Poule de 6 à 12 jours avec 2.000 r. Les œufs sont ensuite remis à 38° et leurs embryons prélevés 30, 90 et 180 minutes

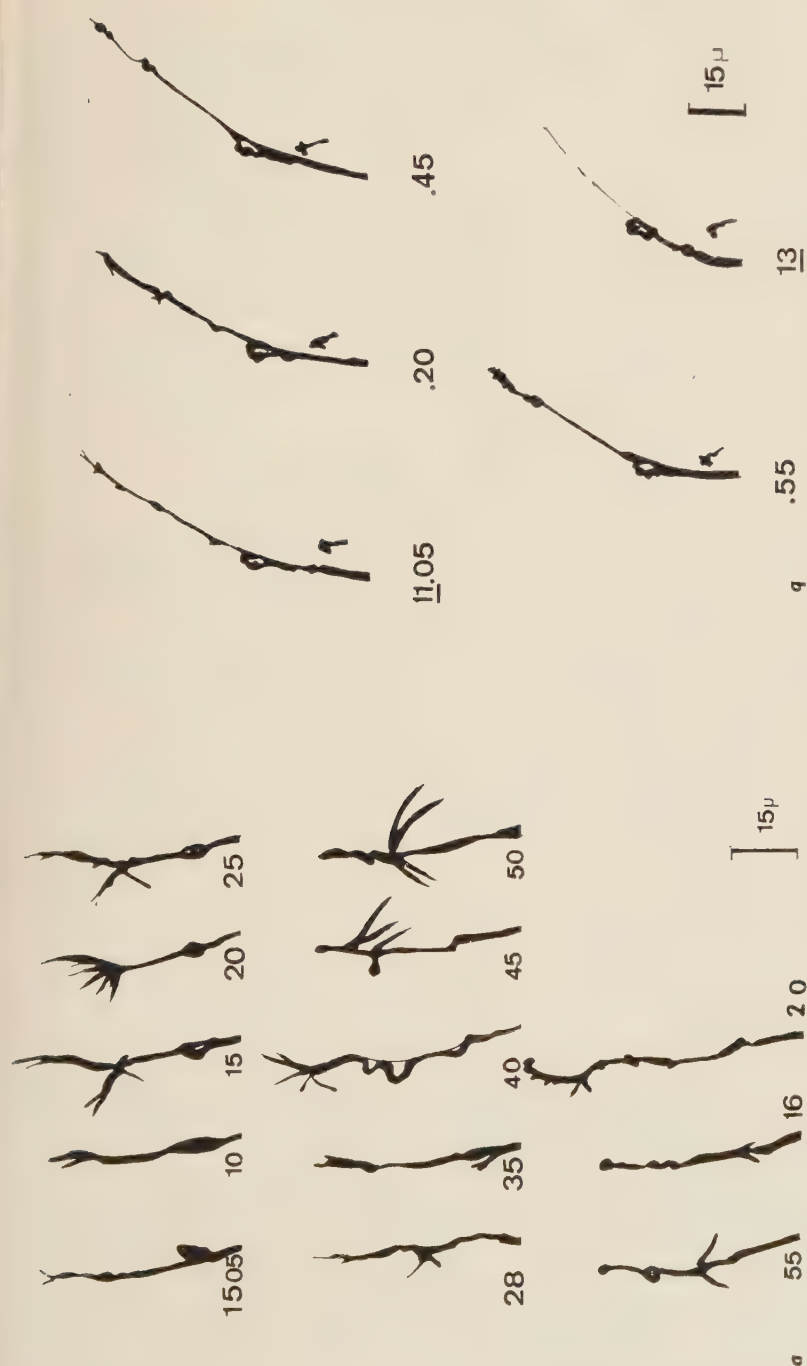


Fig. 3 *a* et *b*. — Croissances apicales de deux cultures irradiées l'une à 2 000 r (*a*) et l'autre à 2 500 r (*b*) après 24 heures de croissance normale. 3 *a*, tassement axonal et vésiculation. 3 *b*, très forte rétraction et vésiculation totale de la fibre une heure après l'irradiation.

après. Leurs ganglions médullaires sont disséqués, puis cultivés selon la méthode de MAXIMOV.

Les résultats sont les suivants :

— L'irradiation produit, 30 minutes après la remise à 38°, des hémorragies céphaliques et des membres dans les embryons de 6 et 12 jours. Ces hémorragies progressent pour être intenses 2,30 h après la remise à 38°. Les viscères sont gorgés de sang et la peau est atteinte tout particulièrement.

— Les ganglions, prélevés 180 minutes après 2.000 r, ne présentent pas de croissance, ni de migration cellulaire en culture. Par contre, les ganglions prélevés 90 minutes après la même dose ont une croissance représentant 10 pour 100 de celle des témoins. Les cellules lésées sont granuleuses, pycnotiques et caryorhétiques. Les axones ont une croissance médiocre. La croissance axonale, obtenue 30 minutes après 2.000 r, est semblable à celle des témoins.

B. — OBSERVATIONS PERSONNELLES

Ces conclusions ont été confirmées dans nos conditions expérimentales sur la moelle épinière cultivée. Pour faire jouer au mieux les effets secondaires exercés sur la moelle par les autres tissus irradiés en même temps qu'elle, deux temps de latence ont été expérimentés : une série de culture est faite immédiatement après la fin de l'irradiation, l'autre 4 heures après la remise à 38° des œufs irradiés (tableau III).

— Les premières périodes d'évolution cytologique *in vitro* (différenciation des neuroblastes en neurocytes, croissance en longueur de jeunes neurites) se déroulent normalement dans la moitié des cultures faites tout de suite après l'irradiation. Mais la période de plein épanouissement axonal ne se produit plus. Les fibres sont granuleuses et vésiculeuses.

— La croissance globale des moelles cultivées 4 heures après leur irradiation *in ovo* baisse de 10 pour 100 par rapport à celle des cultures faites sans temps de latence. Cette baisse affecte surtout les croissances maximales (tableau IV).

— Ces faits impliquent le jeu d'actions secondaires se déroulant pendant les 4 heures de remise à 38°. Leurs effets se manifestent en culture et sont semblables aux effets primaires avec lesquels ils interfèrent. Le manque de spécificité d'actions empêche toute comparaison. Il y aurait sommation des effets primaires (RX) et des effets secondaires (tissus) exagérant les inhibitions et les dégénérescences nerveuses constatées *in vitro*.

La radiorésistance de la moelle épinière semble être mise en brèche par des interactions tissulaires secondaires de type vasculaire. La dégénérescence médullaire *in vitro* serait la conséquence de radiolésions vasculaires et glioblastiques précoces.

TABLEAU III

*Effets immédiats et secondaires des rayons X
sur la culture des moelles d'embryons irradiés en entier dans l'œuf.*

	Doses appliquées	Modalités et durée des irradiations	Durée de la remise à 38° après irradiation	Test = culture en milieu standard sain	Effets sur les fibres néoformées
<i>In ovo</i>	1.500 r	Irradiation de l'œuf entier.		Culture histio- typique en chambre à huile.	États cytol- ogiques et taux de crois- sance.
	1 seule irradiation	20 minutes à 70 kV et 3 mA.	0 h	Moelle irradiée prélevée	24 h
		Irradiation de l'œuf en en- tier.		Culture histio- typique en chambre à l'huile.	
	1 seule irradiation	20 minutes à 70 kV et 3 mA.	4 h	Moelle irradiée prélevée	24 h
					<i>id.</i>

C. — CONCLUSIONS

L'influence prépondérante du temps de latence nécessaire pour obtenir un effet biologique perceptible en culture met l'accent sur l'existence d'une séquence intermédiaire d'événements inconnus entre l'effet direct des rayons X sur la moelle dans son environnement biologique et l'effet constaté *in vitro* au niveau de ses fibres. Nous avons vu que les cellules neuroblastiques irradiées excisées sont beaucoup moins sensibles que si elles sont irradiées *in ovo* pour manifester le même type de dégénérescence *in vitro*. Ceci indique que des tissus irradiés autres que les neuroblastes doivent intervenir dans la réaction, on peut penser :

1° aux cellules nerveuses de soutien, aux glioblastes incluant les cellules de Schwann, et, 2° aux tissus rendus hémorragiques très tôt après

TABLEAU IV

Répartition des pourcentages
de croissance et de non-croissance nerveuses des cultures
faites immédiatement et 4 heures après l'irradiation des embryons.

		Nombre de cultures de 24 heures	Non- croissance 0		Croissance globale 1 + 2 + 3 —		Taux de croissance en pourcentage		
			N	%	N	%	1 +	2 +	3 +
Série 1	1.500 r sans latence	109	56	51,3	53	48,6	19,1	12,2	16,5
Série 2	1.500 r 4 heures de latence	148	91	61,48	57	38,52	18,2	18,9	1,35

% = pourcentage de croissance.

l'irradiation. Les effets secondaires qu'engendrent ces derniers tissus s'ajoutent aux effets primaires précoces qu'ils masquent.

Aux lésions nucléaires des péricaryons, dues à l'ionisation des neuroblastes, succèdent celles dues aux effets secondaires visibles au niveau axonal en culture *in vitro*.

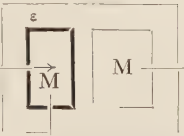
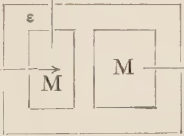
LÉSIONS A DISTANCE DES NEUROBLASTES ET DES NEUROCYTES SAINS EN CULTURE APRÈS MISE EN JEU D'ACTIONS A DISTANCE EXERCÉES *IN OVO* ET *IN VITRO* PAR UN TISSU IRRADIÉ

Les rayons ionisants ont donc des effets cytologiques sur les jeunes neurones, aussi bien que sur les neuroblastes; or, s'il est difficile, en culture, de différencier l'action primaire des irradiations sur la cellule nerveuse de celle secondaire provenant d'effets sur son environnement tissulaire, on peut utiliser la méthode mixte de greffe et de culture pour étudier les actions à distance dues aux irradiations. Afin d'analyser le mode d'action de ces substances libérées par effets secondaires, nous nous sommes proposé de les faire agir sur une cible saine qui en éprouverait les effets. Pour ce faire, nous avons eu recours aux méthodes embryologiques utilisées pour mettre en évidence des effets de substances sur le développement embryonnaire ou tissulaire. Ainsi, nous avons réalisé des actions à distance telles que nous les avons définies entre deux orga-

ismes semblables dont l'un a été au préalable irradié. Elles ont été pro-
troquées, soit *in ovo*, par dépôt ou greffe chorio allantoïdienne de broyats
ou de tissus irradiés sur un hôte sain. La culture du tissu homologue
de cette cible en éprouve et visualise les effets *in vitro* (tableau V), soit,
in vitro, en juxtaposant deux tissus semblables ou non dont l'un est
au préalable irradié, ou en conditionnant le vecteur d'une croissance
saine par un contact préalable avec un tissu irradié (voir tableau VIII).

TABLEAU V

*Modalités d'obtention d'effets à distance réalisés in ovo
et test de leur appréciation par culture in vitro.*

Séries expérimentales	Modalité d'obtention d'actions à distance <i>in ovo</i>	Test mesurant <i>in vitro</i> les effets à distance
I Moelle irradiée 	Greffe chorioallantoï- dienne de 12-16 heures dans l'hôte sain. 	Culture histiotypi- que de 24 heures, de la moelle de l'embryon por- teur d'une héli- moelle irradiée.
		→ 1 Cultures histio- 2 typiques.
II Moelle saine 	Greffe chorioallantoï- dienne de 12-16 heures dans l'hôte sain. 	Culture histiotypi- que de 24 heures de la moelle de l'embryon por- teur d'une héli- moelle saine.
		→ 1 bis Id. 2 bis
1 et 1 bis = héli-moelles irradiées ou non, cultivées sans être greffées, 2 et 2 bis = héli-moelles irradiées ou non, cultivées après avoir été greffées.		
 = moelle entière irradiée.  = moelle entière saine.		

Ainsi, peut-on dissocier les facteurs vasculaire et nerveux qui peuvent intervenir dans la formation des lésions des fibres nerveuses telles qu'on les perçoit en culture *in vitro*.

A. — DÉPÔTS ET GREFFES SUR LA MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDIENNE

1^o A l'instar de CROISILLE (1959) qui a mis en évidence l'action des différents extraits d'organes *in vitro* sur l'embryon de poulet et sur des organes embryonnaires cultivés *in vitro* et de la théorie de P. WEISS par laquelle chaque organe sécrète ses propres inhibiteurs, nous avons essayé de tester l'activité d'extraits d'embryons de poulet irradiés sur un embryon cible qui en subit les effets par greffe chorio-allantoïdienne.

2^o En 1962, nous avons montré que les culots de centrifugation de broyats entiers d'embryons de poulet irradiés par les rayons X *in ovo*, placés sur la membrane chorio-allantoïdienne d'embryons neufs, provoquent chez ceux-ci un syndrome hémorragique à distance (tableau VI).

3^o Nous avons alors greffé sur la membrane, non plus des broyats irradiés, mais des fragments de moelles d'embryons irradiés ou non (témoins) de 7 jours. La culture de la moelle hôte en visualise les effets, celle des moelles irradiées explantées avant ou après greffe leur sert de référence (tableau VII). Il semble, dans le cas de nos greffons (DENÈFLE et MAY, 1962; DENÈFLE, 1962), que la greffe proprement dite influence la

TABLEAU VI

Répartition des embryons survivants, moribonds ou morts en fonction d'une irradiation in ovo et d'effets à distance de broyats embryonnaires irradiés.

	Actions <i>in ovo</i>		Action à distance de broyats irradiés									
	0 h après irra- diation	4 h après irra- diation	1 ^{re} opération					2 ^e opération				
			I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
Survies . . .	15	1	18	16	3	2	15	17	5	0	1	5
Moribonds . .	4	16	0	3	9	8	5	1	2	4	1	0
Morts. . . .	1	3	2	1	6	8	0	0	1	3	4	1

I = broyats entiers normaux.

Broyats irradiés préparés : II = immédiatement après irradiation ; III = 4 heures après irradiation ; IV = Culots préparés 4 heures après irradiation ; V = Surnageants 4 heures après irradiation.

TABLEAU VII

*Longueurs des fibres nerveuses de cultures de 24 heures provenant :
de moelles des porte-greffes, de moelles irradiées ou non
et de moelles d'embryons irradiés ou non,
avant et après leur greffe chorio-allantoïdienne.*

Origine des cultures		Série I (Témoin)				Série II (Irradiée)			
		Min.	Max.	Moy.	Pour 100 par rapport à la moyenne	Min.	Max.	Moy.	Pour 100 par rapport à la moyenne
Moelles des porte-greffes		10 μ	650 μ	350 μ	77,7	50 μ	750 μ	150 μ	43,1
Moelles des donneurs	Avant greffe	49,5 μ	850 μ	450 μ	—	54 μ	800 μ	348 μ	—
	Après greffe	150 μ	706 μ	401 μ	88,5	66 μ	600 μ	251 μ	72,1

cytologie *in vitro* des neurites médullaires néoformés, ces derniers étant toujours hypertrophiés par rapport aux témoins. Quant aux actions à distance exercées par les greffons irradiés sur la croissance *in vitro* de la moelle du porte-greffe, elles se manifestent par une forte inhibition de croissance et par une neurodégénérescence très accentuée. Les substances responsables élaborées dans le greffon au cours de son irradiation semblent provenir d'effets secondaires exercés par : le tissu nerveux (glioblastes, cellules de Schwann) et le tissu vasculaire qui l'irrigue (microhémorragies méningées et intranévraxiques).

4° Nous avons constaté enfin un décalage chronologique entre effets primaires et effets à distance, ainsi que le caractère moins accusé de ces derniers (LUDWIG, 1958). Dans nos cultures de moelles de porte-greffes sains de moelles irradiées (tableau VII), l'effet atténué se traduit par une réduction numérique de fibres lésées (50 pour 100 demeurent indemnes) et par une réduction de la croissance en longueur. L'effet qualitatif, c'est-à-dire la dégénérescence des neurocytes est plus accusée que dans les cultures de moelles irradiées. Il semble bien qu'il y ait une certaine concentration requise de substances libérées par les tissus irradiés pour obtenir des effets à distance. Ces faits permettront de donner une interprétation possible de la formation des lésions nerveuses visibles *in vitro* après actions secondaires et à distance dues aux rayons X.

5° Afin de savoir si les substances émises par le greffon véhiculées par diffusion et par le courant sanguin vers l'axone cible agissent telles quelles ou bien avec le concours d'autres substances présentes dans

l'embryon, le problème nous les a fait agir *in vitro* en éludant ainsi toutes les interactions complexes inhérentes à la greffe proprement dite (tableau VIII).

TABLEAU VIII

Effets à distance exercés par des moelles irradiées sur la croissance histiotypique des neuroblastes de moelles saines.

Moelle irradiée incitatrice

Doses	Modalité et durée	Remise à 38°	Modalités d'action à distance éprouvée	Test	Effets à distance
1,500 r <i>in situ</i>	20 min.	4 h	<i>in ovo</i>	Culture histiotypique de la moelle saine du porte-greffe. 12-16 h 24 h Durée totale = 44 h 20	État de fibres néo-formées
			Greffe chorioallantoïdienne sur embryon sain.		
			<i>in vitro</i>	Culture histiotypique de l'association. 24 h Durée totale = 28 h 20	État des fibres néo-formées
			Association = juxtaposition de 2 fragments médullaires.		
			Lamelle porte-culture saine avec moelle irradiée.	Culture histiotypique de moelle saine après contact avec moelle irradiée.	
			contact 24 h	Durée totale = 52 h 20	

B. — LÉSIONS PROVOQUÉES *in vitro* PAR JUXTAPOSITION ET CONDITIONNEMENT DE TISSUS NERVEUX SAINS ET IRRADIÉS

1° Dans le cas d'interactions exercées entre deux tissus homologues.

Incitateur et cible, tous deux nerveux, le contact préalable de l'incitateur nerveux irradié avec la lamelle qui sert à la culture de sa cible saine

est la modalité la plus efficace, semble-t-il, pour recueillir les substances responsables de l'inhibition de croissance et de la dégénérescence des neurites de la cible (fig. 4 et tableau VIII). Parmi ces substances, il y a tout lieu de croire qu'elles proviennent de l'autolyse de cellules nerveuses particulièrement radiosensibles telles que les cellules de Schwann associées aux neurites amyéliniques (MASUROVSKY, 1967). Ces glioblastes ont une activité mitotique que les jeunes neurocytes ont perdu, ce qui indique leur différence de sensibilité (POMERAT et QUASTEL (1963); GOLDRING (1956) et MASUROVSKY (1967)).

Ces substances, émises par le fragment de moelle irradiée, rappellent par leur mode d'action celles que MARIN (1965) a fait agir pour favoriser la croissance fibroblastique *in vitro*. Pour elle « les propriétés du substratum physique conditionnent l'étalement de la substance, mais non sa formation : le fait que la température d'incubation influence la vitesse de formation de cette substance permet de penser qu'elle n'est pas simplement exsudée, mais synthétisée par les explants cultivés. La nature lipoprotéique du facteur stimulant suggère une parenté avec les membranes cellulaires : on peut penser, dit-elle, qu'il est contenu dans des portions de membranes qui subsisteraient sur le support lorsque les cellules en ont été détachées ».

2° Dans le cas d'interactions entre deux tissus hétérologues (sang irradié et moelle saine).

Le contact du sang avec la moelle pendant toute la durée de sa culture histiotypique provoque une forte inhibition de la croissance nerveuse *in vitro*. Le lavage des cultures dans le liquide de Tyrode ne lève pas l'inhibition nerveuse provoquée par le sang irradié, mais l'atténue (tableau IX). Il semble que les altérations des éléments figurés (vacuolisés) et très sensibles agissent en libérant des substances de cytolyse. Les substances d'hématolyse semblent agir en perturbant :

a) la différenciation des neuroblastes en neurocytes ou la régénération de ces derniers; b) la nutrition des jeunes apex par endocytose; c) la croissance en longueur des jeunes neurites.

3° Conclusions.

Nos conclusions mettent en valeur le rôle des substances émises par le tissu nerveux intrinsèque et par le système vasculaire tous les deux irradiés. Ces substances agissent à la façon de radiomimétiques en provoquant la dégénérescence nerveuse médullaire en culture *in vitro*. Ces faits confirment les résultats de nombreux auteurs sur la participation active du facteur hémal et mettent aussi en relief les actions dues aux altérations de certains glioblastes.

Cette analyse, dont nous venons de suivre les étapes, permet de mieux saisir l'enchaînement des différents facteurs en cause, puisque les prin-

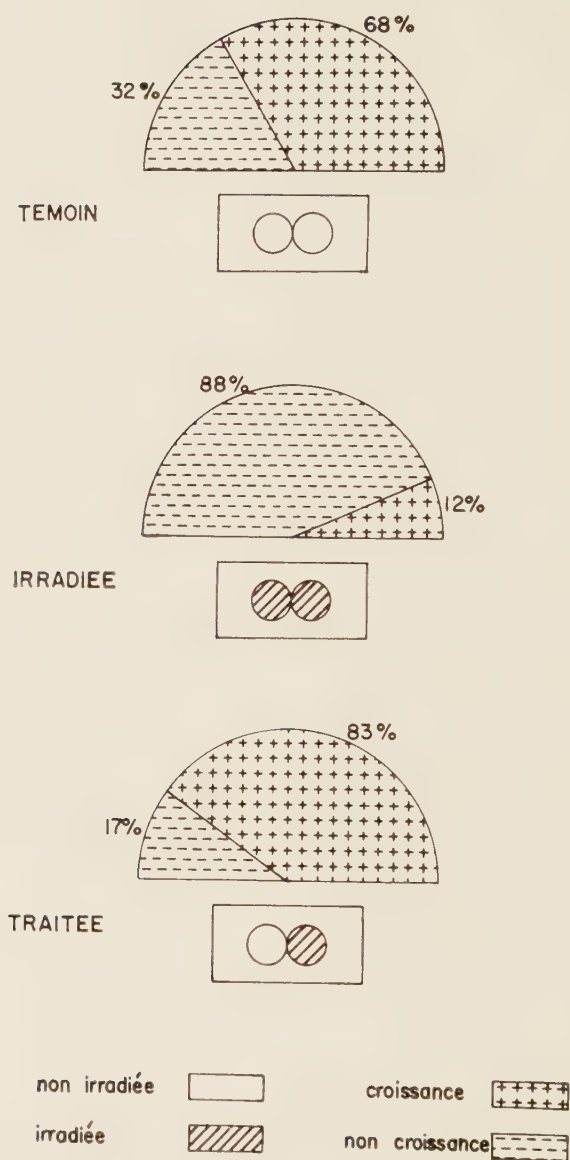


Fig. 4 a.

Fig. 4 a et b. — Diagrammes de non-croissance et de croissance nerveuses : a) après 24 heures de juxtaposition *in vitro* de deux fragments dont l'un, seul, a été irradié.

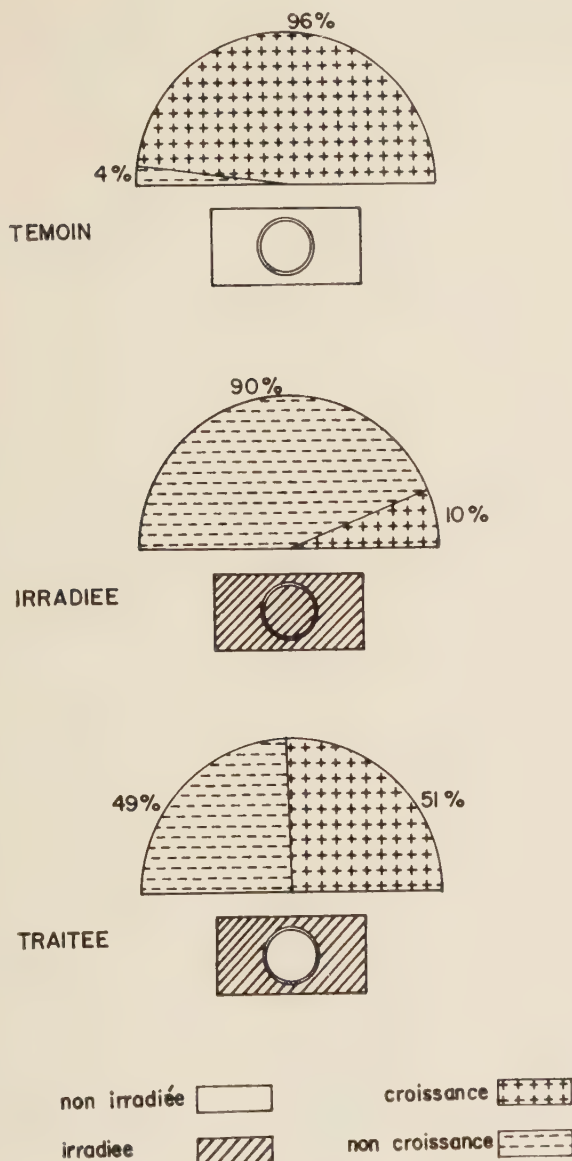


Fig. 4 b.

Fig. 4 a et b. — Diagrammes de non-croissance et de croissance nerveuses : b) après conditionnement du vecteur de croissance d'une moelle saine par un contact préalable avec une moelle irradiée.

TABLEAU IX

*Influence d'un lavage sur la croissance de cultures nerveuses
faites en présence de sang irradié ou non.*

1) SANG SAIN

Moelle saine	Cultures de 24 heures non lavées		Cultures de 48 heures lavées à 24 heures
	Pas de croissance nerveuse. . . .	32	16
	Croissance globale	8	4

2) SANG IRRADIÉ

Moelle saine	Cultures de 24 heures non lavées		Cultures de 48 heures lavées à 24 heures
	Pas de croissance <i>in vitro</i>	21	15
	Croissance globale	18	5

1) Cultures de 24 heures (sans lavage).

	o Cr.	Cr. gl.	χ^2	P
m. s. + s. s.	32	8	18,59	P < 0,001
m. s. + s. i.	21	18		

m. i., moelle irradiée ; m. s., moelle saine ; s. i., sang irradié ; s. s., sang sain.
o Cr, pas de croissance nerveuse ; Cr. gl., croissance globale.

2) Cultures de 48 heures (un lavage à 24 heures).

	o Cr.	Cr. gl.	χ^2	P
m. s. + s. s.	16	4	17,4	P < 0,001
m. s. + s. i.	15	5		

χ^2 , test du khi² ; P, probabilité.

tripaux d'entre eux ont été éprouvés par la méthode de culture *in vitro*. Ainsi, pouvons-nous tenter de donner les interprétations possibles des radiolésions primaires, secondaires et à distance, à partir de nombreuses conclusions précisées dans cette mise au point auxquelles nos propres résultats se sont plus ou moins bien intégrés.

CONCLUSION : MÉCANISMES PROPOSÉS POUR L'INTERPRÉTATION DES LÉSIONS NERVEUSES, PRIMAIRES, SECONDAIRES ET A DISTANCE

A. — MÉCANISMES PROPOSÉS DANS LA LITTÉRATURE

1° *Actions primaires.*

Les effets portant sur le tissu nerveux ganglionnaire ont été les plus étudiés sur le Rat, la Grenouille et l'embryon de poulet. La moelle épinière (embryon de poulet, Lapin) et le cervelet (Chat, Chien et Singe) ont fait aussi l'objet d'irradiation *in situ*, mais, rarement en culture.

Nous ne tiendrons pas compte ici de la modalité d'obtention de ces effets en raison de la grande variété constatée des doses, des temps de latence, de l'âge et de l'espèce utilisée. Précisons que ces effets primaires sont toujours des altérations nucléaires de type pycnose, caryorhexis, vacuolisation et altération nucléolaire et des altérations cytoplasmiques de type vacuolisation autolytique. Ce sont toujours les glioblastes qui les manifestent, les neuroblastes sont, par contre, relativement radio-résistants.

a) Pour certains, ces effets sont obtenus après des temps de latence variés et sont indépendants des effets secondaires de type vasculaire (HICKS, 1954; GOLDRING, 1956; POMERAT, 1959; MASUROVSKY, 1967). ANDRES et PICK précisent, sur les neurones sympathiques de Grenouille irradiée à 1.000 et 2.000 r, que l'altération directe se fait sentir d'abord sur les cellules de Schwann, ainsi que sur les gaines de myéline.

b) Pour d'autres auteurs, les lésions *inflammatoires* et vasculaires (hémorragie) sont *primaires*. SCHOLTZ en 1962 précise que la première étape est un gonflement et une désintégration des endothelia, suivie d'une deuxième étape de neurodégénérescence. La même année, CLEMENTE et RICHARDSON insistent aussi sur l'antériorité des altérations vasculaires sur celles du tissu cérébral chez le Singe et le Rat soumis à 1.000 et 6.000 r. HAGER, en irradiant avec 7.500 et 45.000 r la région médiodorsale du Hamster, conclut aussi à une perturbation vasculaire précoce.

c) Pour d'autres, enfin, comme SCHOLTE et HIRSCHBERGER (1962), il y a *simultanément* des désordres vasculaires et nerveux.

En conclusion, il semble que les cellules de soutien des neuroblastes

et des neurocytes soient fortement radiosensibles. Leur forte activité mitotique étaye cette hypothèse. Ces glioblastes, lésés, réagiraient sur leurs neuroblastes en libérant par voie autolytique des substances « toxiques » et des enzymes protéolytiques agissant directement sur la protéosynthèse intense des jeunes neurocytes.

2° Actions secondaires.

Trois facteurs principaux peuvent intervenir :

a) *Facteur hémodynamique.* — Pour la plupart des auteurs, ce sont des désordres vasculaires et inflammatoires qui agissent en retour sur le système nerveux. Ces effets que les Anglo-Saxons qualifient d'« indirects » ont une réponse visible plus ou moins différée. Ce sont des hémorragies des leptoméniges et des plexus choroïdes (S. VOGEL, 1962), des gonflements et des désintégrations des endothelia précédés d'une augmentation de leur fragilité et d'une diapédèse active des érythrocytes, des lymphocytes et des polynucléaires (CLEMENTE et RICHARDSON, 1962). BOND et FLIEDNER (1965) insistent aussi sur l'infiltration granulocytaire des méninges, des plexus choroïdes et sur la forte granulopénie.

b) *Facteur métabolique.* — En plus du précédent facteur, HICKS, dès 1954, détermine les désordres provoqués par la protéosynthèse perturbée par irradiation. Plus tard, en 1962, CLEMENTE et RICHARDSON mettent en évidence la présence de métabolites anormaux échangés entre le sang et la moelle, ainsi que la forte sensibilité des neuroblastes aux variations métaboliques. C'est surtout MASUROVSKY qui, 5 ans plus tard, a donné la séquence des principaux troubles métaboliques obtenus après irradiation : — altération des acides nucléiques et des protéosynthèses, — réduction de la synthèse de l'A. T. P., — altération des cycles de KREBS et d'oxydation des acides gras, — perturbation des chaînes respiratoires, et, enfin — activation des phosphatases acides nucléaires et cytoplasmiques.

c) *Facteur « toxique ».* — Il a été précisé par TARUSOV et BENEVOLENSK (1957). Pour eux, il y a libération d'éléments toxiques tels que les *hémolysines* et des *substances lipidiques*. MASUROVSKY, en 1967, montre, au microscope électronique, l'existence de zone « toxique » dans le cytoplasme de jeunes neurocytes. Pour lui, les produits libérés par des vacuoles autolytiques de type digestif sont réutilisés par d'autres cellules. Il constate enfin la présence de dépôts de glycogène anormaux et de lipides près de certaines mitochondries au sein des axones.

Tous ces phénomènes sont le résultat d'une activité protéolytique intense. Les enzymes, libérées par irradiation, agissent par voie sanguine ou directement sur le système nerveux (S. VOGEL, 1962).

En bref, la libération de protéases, ribonucléases, lipases et phospholipases provient de cellules très radiosensibles telles que les cellules de Schwann (MASUROVSKY, 1967).

3^o *Actions à distance.*

Elles semblent être aussi les effets perceptibles de cette activité protéolytique dans une zone saine éloignée de la zone irradiée d'un même individu (GEREBTZOFF et HERVÉ, 1949; JOLLES, REMINGTON et SIMON-REUSS, 1961) ou bien, *par échange* entre deux individus (VAN DYKE et HUEFF, 1949; EDELMAN, 1955) ou deux tissus dont l'un a été au préalable irradié comme nous l'avons expérimenté.

Ces actions nous ramènent aux précédentes et incluent : — des actions primaires, si le tissu incitateur a été irradié, excisé, et, — des actions primaires et secondaires si ce même tissu provient d'un organisme irradié en entier.

B. — MÉCANISMES POSSIBLES ÉTAYÉS PAR NOS CONCLUSIONS

1^o *Actions primaires.*

Après irradiation de la moelle excisée, *in situ*, ce sont les médulloblastes en activité mitotique qui sont altérés (pynose, caryorhexis). Les neuroblastes dont la différenciation s'amorce semblent moins atteints. Pour des doses de l'ordre de 3.000 et 3.500 r, il y a même stimulation de la croissance axonale précédant toutefois une dégénérescence précoce et totale des fibres. Cette stimulation a lieu aussi après irradiation totale d'une culture lancée, comme nous l'avons vu, il y a augmentation de la vitesse de croissance horaire de 8,4 μ par rapport à la vitesse témoin (20 μ /heure). Dans ce cas, il y a ensuite aussi dégénérescence apicale des filopodes. *In situ*, d'autres lésions frappent les motoneurons des cornes antérieures qui, après 4 heures de latence, présentent tous une forte chromatolyse des corps de Nissl. Les cellules ganglionnaires paraissent indemnes pour les doses de 1.500 et 2.000 r. Par contre, des lésions hémorragiques sont visibles dans les méninges et la substance grise palléale.

Ces lésions sont particulièrement nettes quatre heures après la remise à 38° C des embryons irradiés en entier.

Les lésions médulloblastiques et surtout glioblastiques, ainsi que les désordres hémodynamiques médullaires sont les premiers effets perceptibles *in situ* des actions primaires dues aux rayons X. *In vitro*, les doses élevées que nous avons dû appliquer à la moelle pour obtenir des effets en culture sont incompatibles avec la survie embryonnaire (3.500 et 4.500 r) et indiquent la *radiorésistance relative des neuroblastes* et, plus particulièrement, des axones des jeunes neurocytes qui ont pu se différencier ou régénérer en culture histiotypique. Ces conclusions que nous avons précisées avec MAY, dès 1960, ont été retrouvées sur des cultures organotypiques irradiées de ganglions rachidiens de Rat par MASUROVSKY (1967), en utilisant des doses supérieures aux nôtres. Si la culture organotypique irradiée des ganglions lui a permis de déceler des troubles

cytologiques aux niveaux des péricaryons et aussi des neurites, elle ne lui a pas permis d'en mesurer les effets sur la croissance apicale, ni de déterminer les taux de croissance de fibres néoformées à partir de moelle irradiée cette fois coupée de toutes interactions possibles :

En conclusion, nous avons précisé et retrouvé les faits suivants :

In situ : Après irradiation à 1.500 r-2.000 r :

1^o la radiorésistance relative des jeunes neurocytes, stimulation de la vitesse apicale précédant la neurodégénérescence; 2^o la radiosensibilité des glioblastes; et, 3^o la forte radiosensibilité du tissu sanguin et vasculaire médullaire.

Ces trois types d'actions peuvent, semble-t-il, interférer dans la formation des effets primaires perceptibles dans l'embryon.

In vitro : Après irradiation à fortes doses (3.500 r) de la moelle excisée :

1^o la radiorésistance relative des axones néoformés; 2^o leur différenciation et régénération possibles en culture histiotypique, accompagnées d'une courte période de stimulation de croissance de type 2 +; et, 3^o leur dégénérescence précoce (24 heures de culture suffisent).

2^o Actions secondaires.

L'hémorragie embryonnaire, provoquée après irradiation à 1.500 r de l'embryon de poulet de 7 jours qui se développe dans les quatre heures de remise à 38° C qui suivent le radiotraitement, confirme les états purpuriques déjà décrits dans la littérature, en particulier par I. P. GOLD-RING sur des embryons de 6 et 12 jours. Le sang d'un tel embryon agit *in vitro* lorsqu'il est mis en contact d'un fragment médullaire sain. La croissance des neurites est fort réduite et les neurites néoformés dégèrent après l'involution classique : aspect moniliforme réversible, granulisation et vacuolisation irréversibles.

Ces lésions axonales, après 24 heures de culture, sont d'autant plus marquées que la moelle cultivée a été prélevée plus tard après la remise à 38° C de l'embryon dont elle provient. Le taux de croissance axonale d'une culture médullaire faite 4 heures après son irradiation baisse de 10 pour 100 par rapport à celui d'une culture faite immédiatement après le radiotraitement. Le temps de latence précisé implique le *jeu d'actions secondaires parmi lesquelles le facteur hémal est particulièrement actif*.

3^o Actions à distance.

Nous n'avons pas pu montrer ici l'importance des facteurs métabolique et « toxique », toutefois les lésions des fragments médullaires irradiés libèrent des substances de cytolyse qui agissent sur un porte-greffe sain en altérant la croissance axonale de sa moelle cultivée *in vitro*. Cette action par greffe semble fonction de la quantité de substances ayant atteint

la moelle-hôte puisque dans une de ces cultures, 50 pour 100 des fibres sont *totale*ment lésées, les 50 pour 100 autres demeurent indemnes. Cette quantité semble plus abondante dans la culture de moelle irradiée où toutes les fibres sont alors lésées.

Nous avons pu, enfin, prouver l'existence de ces substances en les faisant agir, *in vitro*, par juxtaposition de deux tissus nerveux dont l'un sert de cible à l'autre irradié et surtout par dépôt sur une lamelle conditionnée par un contact préalable avec une culture irradiée. La culture expérimentale saine qui éprouve ce contact en visualise et en mesure les effets inhibiteurs comme nous l'avons précisé.

Nos expériences ont montré que l'incitateur fait intervenir des effets primaires au niveau des neuroblastes et plus particulièrement des glioblastes et des actions secondaires de type hémal. En effet, la moelle provient d'un embryon de poulet irradié en entier, sa cible étant le tissu homologue d'un deuxième embryon sain cible.

Nous avons vu que les actions primaires et secondaires déclenchées au niveau lombo-sacré de la moelle épinière ont des effets sur : le sang médullaire, les glioblastes (oligodendroblastes, astroblastes), les neuroblastes.

Ces derniers sont les plus *radiorésistants*. Cependant, ils peuvent subir *in situ* des effets « indirects » provoqués par la cytolyse des cellules sanguines et glioblastiques très sensibles aux rayons X. Cette sommation d'effets primaires peut agir en augmentant la sensibilité neuroblastique.

In ovo : Ce sont ces effets groupés qui altèrent, après greffe chorio-allantoïdienne de moelle irradiée, la croissance en culture de la moelle de l'hôte sain. Il semble que, dans ce cas, les éléments nerveux qui interviennent ne soient pas seuls. Si ce sont des broyats totaux d'embryons rendus hémorragiques après irradiation totale qui agissent dans le même site de greffe sur un receveur neuf, le facteur vasculaire est alors bien mis en évidence.

In vitro : Les deux facteurs nerveux et hémorragique pris *isolément* jouent sur la croissance d'une moelle saine cible :

1° Les cellules nerveuses médullaires radiolésées perturbent la croissance nerveuse axonale de la cible. Après 24 heures de juxtaposition en culture d'un fragment sain et d'un autre irradié, l'inhibition de la croissance atteint 17,5 pour 100 de celle du cas témoin. Après 48 heures de conditionnement, le taux d'inhibition augmente et atteint 59 pour 100.

2° Si la cible nerveuse est soumise à du sang entier d'embryon irradié, après 24 heures de contact en culture l'inhibition de croissance atteint le même taux.

L'importance d'inhibition axonale due aux deux effets, médullaire et sanguin, semble la même, mais on ne peut pas préciser quel est le facteur déterminant. Si les durées de culture sont toutes semblables (24 heures), les modalités d'obtention des actions à distance diffèrent. En effet, le sang agit directement; la moelle, au contraire, éprouve les effets de

substances déposées au cours des 24 heures de culture primaire qui précède la culture expérimentale cible. Mais dans le cas de la juxtaposition, la différence des taux de croissance nerveuse de 42,5 pour 100 en faveur du facteur hémal permet de penser que son action est plus importante que celle du facteur nerveux.

Tous ces effets, obtenus en culture histiotypique en chambre à huile de DE FONBRUNE, ont été perceptibles au microscope à contraste de phase en immersion 1.000 et en microcinématographie image par image. D'autres problèmes se posent et semblent pouvoir être accessibles au microscope électronique. Ce sont :

— la formation des vacuoles de dégénérescence aux niveaux axonal et apical et le mode d'action de leur contenu sur des axones sains; — la localisation et l'évolution des lysosomes des neurites néoformés altérés; et — les effets sur les membranes axoplasmiques et endothéliales de l'irradiation et des enzymes libérés (hydrolases, protéases, etc.) par des cellules particulièrement sensibles telles que les glioblastes, y inclus les cellules de Schwann et les cellules du système vasculaire.

BIBLIOGRAPHIE

- AMATO (A.), 1920-1921. — Azione delle sostanze radioattive sull'accrescimento dei tessuti coltivati *in vitro*. *Ann. Clin. Med., Palermo*, **10**, 107-117.
- ANDRES (K. H.), 1963. — Elektronen mikroskopische Untersuchungen über Strukturveränderungen an Blutgefäßen und am Endoneurium in spinal Ganglien von Rattens nach Bestrahlung mit 185 MeV Protonen. *Z. Zellforsch.*, **61**, 23.
- BOND (V. P.), FLIEDNER (T. M.) et ARCHAMBEAU (J. O.), 1965. — *Mammalian radiation lethality. A disturbance in cellular kinetics*. Acad. Press, New York, 1-340.
- BURROWS (M. T.), 1911. — The growth of tissue of the chicken embryo outside the animal body with special reference to the nervous system. *J. exper. Zool.*, **10**, 63-84.
- BUCCIANTE (L.) et FOA (A.), 1933. — Effetti dell'irradiazione con raggi alfa di emana- zione di radio sopra cellule di varia natura coltivate *in vitro*. *Soc. Ital. Anat., Monitore Zool. Ital.*, suppl. **44**, 58-60.
- CARLESÌ (O.) et OLIVO (O. M.), 1969. — Sensibilità dei neuroblasti coltivati *in vitro* alle radiazioni ionizzante. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, fasc. 15, 996-998.
- CLEMENTE (C.) et RICHARDSON (H. E.), Jr., 1962. — Some observations on radiation effects on the blood-brain barrier and cerebral blood tissues, in: *Response of the nervous system to ionizing radiation*. T. J. Haley et R. S. Snider, éd., Acad. Press, New York, 411-428.
- CROISILLE (Y.), 1959. — Action de différents extraits d'organes sur l'embryon de poulet et sur des organes embryonnaires cultivés *in vitro*. *Thèse d'État*, Paris, Masson, éd., 360-400 p.
- DENÈFLE (J. P.) et MAY (R. M.), 1960. — Actions directes des rayons ultraviolets et X sur la croissance *in vitro* des fibres nerveuses de moelles irradiées d'embryons de poulet. *Arch. Anat. Micr. Morphol. exper.*, **49**, 395-410.
- DENÈFLE (J. P.), 1962. — Effets sur la vascularisation de l'embryon de poulet de broyats embryonnaires irradiés. *C. R. Ass. Anatomistes*, 48^e Réun., Toulouse, 523-532.

- DENÈFLE (J. P.), 1965. — Action à distance par greffe chorio-allantoïdienne de fragments de moelles épinières irradiées par les rayons X, sur la croissance en culture de la moelle du porte-greffe. *C. R. Soc. Biol.*, **159**, 51-54.
- DENÈFLE (J. P.), 1966. — L'irradiation des cultures de tissus nerveux, in : *Culture et greffe des cellules nerveuses chez les Vertébrés supérieurs*, par R. M. MAY. Chapitre IV, 117-138. Monographie de physiologie causale. Chapitre VI. Gauthier-Villars, éd., 1-207.
- EDELMAN (A.), 1955. — Toxicity of serum from irradiated animals. *Science*, **121**, 622.
- ESAKI (S.), 1929. — New studies of nervous tissues cultured *in vitro*. *C. R. Ass. Anatomistes*, **24**, 223-235.
- GEREBTZOFF (M. A.) et HERVÉ (A.), 1949. — Modification précoce et passagère de l'oligodendrogliose après application de rayons X sur les pattes postérieures du Lapin. *C. R. Soc. Biol.*, **143**, 880.
- GRIGORIEFF (L. M.), 1933. — Differenzierung des Nervengewebes ausserhalb des Organismus. II. Mitteilung. *Arch. für Exp. Zellforsch.*, **13**, 195-220.
- GODINA (G.), 1953. — Varie modalità d'accrescimento degli assoni da espianti di centri nervosi. *Soc. Ital. Anat. XV^e Convegno Sociale, Monitore Zool. Ital.*, suppl. **62**, 452-463.
- GODINA (G.), 1955. — L'espressione morfologica dell'accrescimento delle fibre nervose. *Soc. Ital. Anat. XVI^e Convegno Sociale, Monitore Zool. Ital.*, suppl. **63**, 1-31.
- GOLDFEDER (A.), 1940. — Further studies on the effects of irradiations on proliferation and metabolic processes of normal and malignant tissues. IV. Effects produced by different dosage rates of X-rays radiation on the proliferation of various tissues grown *in vitro*. *Radiology*, **35**, 210.
- GOLDRING (I. P.), 1956. — The effects of X-rays on the growth of spinal ganglia from 6- and 12-day chick embryo in tissue culture. *Rad. res.*, **5**, 390-403.
- HAGER (H.), HIRSCHBERGER (W.) et BREIT (A.), 1962. — Electron microscope observations on the X irradiated central nervous system of the Syrian Hamster, in *Response of the nervous system to ionizing radiations*. Haley et Snider, éd., Acad. Press, 1-783.
- HARRISON (R. G.), 1908. — Regeneration of peripheral nerves. *Anat. Rec.*, **1**, 8, 209.
- HARRISON (R. G.), 1910. — The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J. Exper. Zool.*, **9**, 787-846.
- HICKS (S.), 1953. — Effects of ionizing radiation on the adult and embryonic nervous system. Metabolic and toxic diseases of the nervous system. *Proc. Ass. W. Wilkins C. Y.*, 459-462.
- HICKS (S.), 1954. — The effects of ionizing radiation, certain hormones and radio-mimetic drugs on the developing nervous system. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **43**, 151-178.
- HUGHES (A. W. F.), 1953. — The growth of embryonic neurites. A study of cultures of chick neural tissues. *J. Anat.*, **87**, 150-162.
- HUZELLA (T.), 1938. — Comportement des éléments nerveux en culture présenté par la microcinématographie en rapport avec quelques questions discutées en neurohistologie. *C. R. Ass. Anat.*, **33**, 235-241.
- IGNATIEVA (Z.), 1938. — Differentiation of neuroblasts in cultures. *C. R. Acad. Sci., U. R. S. S.*, **20**, 6, 505-508.
- JOLLES (B.), 1941. — X-rays skin reactions and the protective role of normal tissues. *Brit. J. Radiol.*, **15**, **14**, 110-112.
- JOLLES (B.), 1950. — The reciprocal vicinity effect of irradiated tissues on a « diffusible substance » in irradiated tissues. *Brit. J. Radiol.*, **23**, 265, 18-24.
- JOLLES (B.) et GREENING (S. G.), 1958. — Studies on indirect radiation effects with skin grafting experiments and colorimetric estimations of erythema. *Brit. J. Radiol.*, **31**, 136-155.
- JOLLES (B.) et REMINGTON (M.), 1960. — The role of diffusible substances in skin radiation response. *Proc. Brit. Inst. Radiol.*, 1-67.
- JOLLES (B.), REMINGTON (M.) et S. REUSS (I.), 1960. — Indirect radiation effects and diffusible factors in irradiated tissues (Stromatex). *Acta Radiol.*, 57-64.

- KUYPER (C. M. A.) et SMETS (L. A.), 1962. — Role of the medium in radiation effects on cells cultivated *in vitro*. *Naturwissenschaften*, **49**, 21.
- LEVI (G.), 1917. — Connessioni e struttura degli elementi nervosi sviluppati fuori dell'organismo. *Mem. Accad. Lincei*, **12**, 142-182.
- LEVI (G.), 1934. — Explanation besonders die Struktur und die biologischen Eigenschaften der *in vitro* gezüchteten Zellen und Gewebe. *Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch.*, **31**, 125-707.
- LEVI (G.) et MEYER (H.), 1933. — Divisione mitotica di cellule nervose in colture *in vitro*. *Accad. Naz. Rome, Cl. Sci. fis. mat. nat. Atti e Rendic. ser.*, **18**, 352-358.
- LEVI (G.) et MEYER (H.), 1937. — Die Struktur der lebenden Neuronen. *Anat. Anz.*, **83**, 401-422.
- LEVI (G.) et MEYER (H.), 1941. — Nouvelles recherches sur le tissu nerveux cultivé, *in vitro*. Morphologie, croissance et relations réciproques des neurones. *Arch. Biol.*, **52**, 2, 133-278.
- LEVI-MONTALCINI (R.) et LEVI (G.), 1943. — Recherches quantitatives sur la marche du processus de différenciation des neurones dans les ganglions spinaux de l'embryon de poulet. *Arch. Biol.*, **54**, 189-206.
- LEWIS (W. H.) et LEWIS (M.), 1912. — The cultivation of sympathetic nerves from the intestine of chick-embryos in saline solutions. *Anat. Rec.*, **6**, 7-31.
- LEWIS (W. H.), 1931. — Pinocytosis. *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, **49**, 17-26.
- LEWIS (W. H.), 1943. — Axon growth and regeneration. *Anat. Rec.*, **91**, 287.
- LEWIS (W. H.), 1950. — Motion pictures of neurons and neuroglia in tissue culture, in : *Genetic Neurology*. P. Weiss, éd., Univ. Press, Chicago Illinois, 1-239 (53-65).
- LUDWIG (F.), 1958. — Études sur les effets à distance dans les organismes multicellulaires irradiés. *Thèse, Paris*, 1-100.
- MARIN (L.), 1965. — Contribution à l'étude de la migration de cellules embryonnaires de poulet cultivées *in vitro*. *Soc. Zool. Fr.*, **35**, 1-85.
- MARTINOVIC (P. N.), 1931. — Migration and survival *in vitro* of the nerve cells cultivated in the cerebro spinal fluid of the embryo and the young animal. *Arch. exper. Zellforsch.*, **12**, 145-156.
- MASUROVSKY (E. B.), BUNGE (M. B.) et BUNGE (R. P.), 1967. — Cytological studies of organotypic cultures of Rat dorsal root ganglia following X-irradiation *in vitro*. I. Changes in neurons and satellite cells. II. Changes in Schwann cells, myelin sheaths, and nerve fibers. *J. Cell Biol.*, **32**, 2, 467-518.
- MATSUMOTO (T.), 1920. — The granules, vacuoles and mitochondria in the sympathetic nerve fibers cultivated *in vitro*. *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, **31**, 91-93.
- MAY (R. M.), COURTEY (B.) et DENÈFLE (J. P.), 1961. — Observations *in vitro* de la transformation des médulloblastes en neurocytes chez l'embryon de poulet. *C. R. Acad. Sci.*, **252**, 4043-4045.
- MAY (R. M.) et COURTEY (B.), 1966. — L'individualisation dans la formation, le fonctionnement et la régénération de la cellule nerveuse en culture. *Année Biol. Fr.*, **5**, 469-498.
- MAY (R. M.) et DENÈFLE (J. P.), 1960. — Action directe des rayons X sur la croissance *in vitro* des fibres nerveuses de moelles irradiées d'embryons de poulet. *C. R. Acad. Sci.*, **250**, 3229-3231.
- MAY (R. M.) et DENÈFLE (J. P.), 1960. — Action directe des rayons ultraviolets sur la croissance *in vitro* des fibres nerveuses de moelles irradiées d'embryons de poulet. *C. R. Acad. Sci.*, **250**, 3058-3060.
- MAY (R. M.) et DENÈFLE (J. P.), 1966. — L'irradiation des cultures de tissus nerveux. *Arch. Zool. ital.*, **51**, 97-116.
- MAY (R. M.) et GUIMARD (J.), 1964. — Action de substances endogènes et exogènes sur le tissu nerveux en culture. *Année Biol. Fr.*, **3**, 137-162.
- MAY (R. M.) et THILLARD (M. J.), 1954. — Effets d'extraits de nerfs sains et dégénérés sur des cultures de tissu nerveux de l'embryon de poulet. *Arch. Biol.*, **65**, 339-362.
- MEYER (H.), 1938. — Neure Beobachtung bei der Züchtung von Rattenhirnexplantaten aus Hühnerembryonen vorgerückter Stadien. *Riv. Biol. Rome*, **26**, 423-433.

- MOSSA (S.), 1926. — La vitesse d'accroissement des fibres nerveuses cultivées *in vitro* en fonction de la température. *C. R. Ass. Anat.*, **21**, 403-407.
- OLIVO (O.), 1927. — Differenziazione del tessuto nervoso embrionale di pollo coltivato per poi settimane *in vitro*. *Arch. Exper. Zellforsch.*, **5**, 46-76.
- PETERSON (E. R.) et MURRAY (M. R.), 1955. — Myelin sheath formation in culture of avian spinal ganglia. *Amer. J. Anat.*, **96**, 319.
- PETERS (K.), 1959. — Ueber indirekter und direkte Strahlenwirkungen und Krebszellen in Gewebe Kulturen *in vitro*. *Strahlentherapie, Sonderbände*, **43**, 373.
- PICKS (J.), 1965. — The fine structure of sympathetic neurons in X-irradiated frogs. *Cell Biol.*, **26**, 2, 335-351.
- POMERAT (C. M.) et COSTERO (J.), 1956. — Tissue cultures of Cat cerebellum. *Amer. J. Anat.*, **99**, 211-247.
- POMERAT (C. M.), 1959. — Rhythmic contraction of Schwann cells. *Science*, **130**, 1759.
- QUASTEL (M. R.) et POMERAT (C. M.), 1963. — Irradiation of cells in tissue culture. VIII. Morphological observations of neurons following cobalt-60 γ irradiation of dorsal root ganglia from the newborn rat. *Z. Zellforsch.*, **59**, 214-223.
- RAMON Y CAJAL (S.), 1890. — A quelle époque apparaissent les expansions des cellules nerveuses de la moelle épinière du poulet ? *Anat. Anz.*, **8**, 609-613, 631-639.
- RAMON Y CAJAL (S.), 1928. — *Degeneration and regeneration of the nervous system*. Trans. R. M. MAY, Oxford, Univ. Press.
- ROSE (G. G.), 1963. — *Cinemicrography in cell biology*. Acad. Press, New York, 1-500.
- SCHOLZ (W.), SCHLOTE (W.) et HIRSCHBRERGER (W.), 1962. — Morphological effect of repeated low dosage and single high dosage application of X-irradiation to the central nervous system. In : *Response of the nervous system to ionizing radiation*. Haley-Snyder, éd., Acad. Press, 1-783.
- SHOREY (M. L.), 1911. — A study of the differentiation of neuroblasts in artificial culture media. *J. Exper. Zool.*, **10**, 85-93.
- TARUSOV (B. N.) et BENEVOLENSK (V. N.), 1957. — In : *Primary processes in radiation sickness*. In : *Response of nervous system to ionizing radiation*. Haley-Snyder, éd., Acad. Press, 1-783.
- TROWELL (O. A.), 1966. — Cells and tissues in culture methods, biology and physiology. *Tissue culture in radiobiology*. II, 64-136. Willmer, éd., Acad. Press, 1.
- VAN DYKE (G.) et HUEFF (R.), 1949. — Epilation in the non-irradiated member of parabiotically united Rats. *Proc. Soc. Exper. Med. Biol.*, **72**, 266.
- VOGEL (S.), 1959. — Changes in the fine structure of cerebellar neurons following ionizing radiations. *J. Neuropath. and Exper. Neurol.*, **180**, 580.
- WEISS (P.), 1941. — Nerve patterns. The mechanics of nerve growth. 3rd growth symposium. *Growth*, **5** (suppl.), 163-203.
- WEISS (P.), 1934. — *In vitro* experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *J. Exper. Zool.*, **68**, 393-448.

